利用种特异性 COI 引物(SS-COI)鉴别扶桑绵粉蚧

田 虎[1], 李小凤[1], 万方浩[1,2], 张桂芬[1,2,*], 张金良[3]
(1. 中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193;
2. 农业部外来入侵生物预防与控制研究中心, 北京 100081; 3. 北京市植保站, 北京 100029)

摘要: 扶桑绵粉蚧 *Phenacoccus solenopsis* Tinsley 是我国近年新发现的一种严重威胁农林业生产的重要外来入侵害虫。针对扶桑绵粉蚧与其他粉蚧类昆虫难以准确快速识别且适生区广泛的问题, 以扶桑绵粉蚧为靶标, 以我国常见的其他 7 种粉蚧为参照, 采用基于线粒体 DNA 细胞色素 C 氧化酶亚基 Ⅰ (mtDNA COI) 基因序列的种特异性(species-specific COI, SS-COI) PCR 方法, 研究其快速分子检测技术。通过已知粉蚧的 COI 基因序列设计通用型引物 1 对, 获得扶桑绵粉蚧及其他 7 种粉蚧包括康氏粉蚧 *Pseudococcus comstocki* Kuwana、南洋臀纹粉蚧 *Planococcus lilacius* Cockerell、木槿曼粉蚧 *Maconellicoccus hirsutus* (Green)、甘蔗红粉蚧 *Saccharicoccus sacchari* (Cockerell)、新菠萝灰粉蚧 *Dysmicoccus neobrevipes* Beardsley、番石榴粉蚧 *Planococcus minor* Maskel 和石蒜绵粉蚧 *Phenacoccus solani* Ferris 的 COI 基因序列, 根据测序结果及数据库中已知粉蚧的 COI 基因序列设计 SS-COI 引物 1 对(PSZTF1/PSZTR1), 其扩增片段大小为 546 bp。种特异性检验结果表明, 该引物只对扶桑绵粉蚧的 COI 基因具有扩增能力, 对其他 7 种粉蚧不具有扩增效果; 该引物不仅对成虫具有良好的扩增能力, 对不同虫态的扶桑绵粉蚧以及来自我国不同省市的 14 个地理种群和口岸截获的来自巴基斯坦的扶桑绵粉蚧亦具有同样的扩增效能。这些结果表明, 该技术体系完全可用于扶桑绵粉蚧的准确识别及其检测监测, 对有效阻截其进一步扩张蔓延意义重大。

关键词: 扶桑绵粉蚧; 粉蚧; 种特异性 COI 引物; 分子检测; 快速鉴定
中图分类号: Q966 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2013)06-0689-08

Identification of *Phenacoccus solenopsis* Tinsley (Hemiptera: Pseudococcidae) with species-specific COI (SS-COI) primers

TIAN Hu[1], LI Xiao-Feng[2], WAN Fang-Hao[1,2], ZHANG Gui-Fen[1,2,*], ZHANG Jin-Liang[3] (1. State Key Laboratory for the Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 2. Center for Management of Invasive Alien Species, Ministry of Agriculture, Beijing 100081, China; 3. Beijing Plant Protection Station, Beijing 100029, China)

Abstract: *Phenacoccus solenopsis* Tinsley, a new invasive species in China, is a worldwide pest causing serious threat to the production of agriculture and forestry. Morphological identification of this mealybug species is limited by high degree of similarity and polymorphism. In the present study, a method was described for the development of DNA markers for rapidly identifying *P. solenopsis*. A pair of universal primers was designed based on published mitochondrial DNA cytochrome c oxidase subunit Ⅰ (mtDNA COI) gene sequences of mealybugs in GenBank. The mtDNA COI genes from *P. solenopsis* and seven other mealybug species common in China including *Pseudococcus comstocki* Kuwana, *Planococcus lilacius* Cockerell, *Maconellicoccus hirsutus* (Green), *Saccharicoccus sacchari* (Cockerell), *Dysmicoccus neobrevipes* Beardsley, *Planococcus minor* Maskel and *Phenacoccus solani* Ferris were amplified and sequenced. And then one pair of species-specific COI (SS-COI) primers was designed. The SS-COI primers amplified a single band of 546 bp from *P. solenopsis*. The specificity of the primer pair was validated using the seven other mealybug species mentioned above. The results showed that all and only *P. solenopsis* specimens were detected, and no cross reactions with other mealybugs were observed. The method was tested with individuals of the egg, 1st, 2nd and 3rd instar nymph and female adult, and demonstrated to be applicable for all life stages. Furthermore, the primer set was tested with one *P.*

基金项目: 国家"973"计划项目(2009CB119200); 公益性行业(农业)科研专项(201103026)
作者简介: 田虎, 男, 1983 年 7 月生, 山东宁阳人, 硕士研究生, 研究方向为入侵生物学与分子生态学, E-mail: tianhu310@163.com
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: guifenzhang3@163.com
收稿日期 Received: 2013-03-12; 接受日期 Accepted: 2013-06-13

solenopsis population from Pakistan and fourteen *P. solenopsis* populations from invaded areas in China and proved to be applicable for all geographic populations. The diagnostic PCR assay developed here provides a quick, simple and reliable molecular technique for the identification and monitoring of *P. solenopsis*, which will be useful in intercepting and blocking the further spreading of *P. solenopsis*.

Key words: *Phenacoccus solenopsis*; mealybugs; species specific COI (SS-COI) primers; molecular detection; rapid identification

扶桑绵粉蚧 *Phenacoccus solenopsis* Tinsley 属半翅目(Hemiptera),蚧总科(Coccoidea),粉蚧科(Pseudococcidae),是近年来出现的一种重要入侵害虫(Tinsley, 1898; Arif *et al*., 2009; 武三安和张润志, 2009; 朱艺勇等, 2011),其寄主范围十分广泛,已有的研究表明,其寄主植物有 53 科 154 种,包括农作物、园林植物、杂草和灌木等,并且随着调查研究的深入,其寄主范围有进一步扩大的趋势(Arif *et al*., 2009)。扶桑绵粉蚧主要以雌性成虫和若虫吸食寄主植物汁液造成直接危害,为害部位以寄主植物的幼嫩组织为主,种群大暴发时也可群居在寄主植物的老枝和主茎上取食为害,受害植株长势衰弱,生长缓慢或停止,失水,甚至干枯死亡;此外,成虫和若虫分泌的蜜露常诱发煤污病的发生,影响植物的光合作用,从而导致叶片脱落,严重时可造成植株成片死亡(Dutt, 2007; 武三安和张润志, 2009)。

我国于 2008 年在广东省广州市的园林绿化植物扶桑上首次发现扶桑绵粉蚧(马骏等, 2009; 武三安和张润志, 2009),之后的风险分析结果表明,该害虫在我国具有广泛的潜在分布区域(王艳平等, 2009; 马骏等, 2011)。为此,2009 年农业部、国家质量监督检验检疫总局根据扶桑绵粉蚧在国际上的发生危害现状,联合发布公告将其列入《中华人民共和国进境植物检疫性有害生物名录》,并要求各出入境检验检疫机构依法加强对该虫发生国家或地区寄主植物的检验检疫。

通常,扶桑绵粉蚧的种类识别主要基于成虫的外部形态特征,包括雌性成虫的体长、足和腹脐的颜色、体背斑点的数目、蜡丝与体长的比例,以及雄性成虫的体长、体色等(武三安和张润志, 2009; Vennila *et al*., 2010; 朱艺勇等, 2011),而这些识别特征对于口岸经常截获的幼体(包括卵和 1~3 龄若虫)的鉴别则无能为力。因此,传统的形态学方法难以满足口岸检疫以及引种和种苗调运过程中对外来入侵生物快速准确识别与鉴定的现实需求,尤其当截获的样本为幼体或残体时(Ashfaq *et al*., 2010; Singh *et al*., 2012),或当存在隐存种时(Chu *et al*., 2009; 陈哲等, 2012),而扶桑绵粉蚧的快速准确识别是有效阻截其进一步传播扩散的必要前提。

本研究围绕扶桑绵粉蚧极易随植物产品及其苗木等的调运而传播蔓延,对农林业生产存在巨大威胁,却难以进行快速准确鉴别的科学问题,采用基于线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA)细胞色素 C 氧化酶亚基 Ⅰ (cytochrome c oxidase subunit Ⅰ, COI) 基因序列的种特异性 PCR (species-specific COI, SS-COI)的技术与方法,从检测监测的角度,研究其快速检测技术;同时,以我国常见的粉蚧科其他属种的 7 种粉蚧包括康氏粉蚧 *Pseudococcus comstocki* Kuwana、南洋臀纹粉蚧 *Planococcus lilacius* Cockerell、木槿曼粉蚧 *Maconellicoccus hirsutus* (Green)、甘蔗红粉蚧 *Saccharicoccus sacchari* (Cockerell)、新菠萝灰粉蚧 *Dysmicoccus neobrevipes* Beardsley、番石榴粉蚧 *Planococcus minor* Maskel、石蒜绵粉蚧 *Phenacoccus solani* Ferris 等为对象进行种特异性检验,以不同虫态和不同地理种群的扶桑绵粉蚧进行了应用验证。该检测技术体系的建立为扶桑绵粉蚧快速检测与准确识别提供了依据,为有效阻截扶桑绵粉蚧在我国的进一步传播扩散和危害提供了技术保障。

1 材料和方法

1.1 供试虫源

扶桑绵粉蚧由海南大学环境与植物保护学院赠送,为室内饲养种群,寄主为市售南瓜;新菠萝灰粉蚧由中国热带农业科学院植物保护环境保护研究所赠送,为网室饲养种群,寄主植物为剑麻;康氏粉蚧采自湖北荆州,寄主植物为温州蜜柑 *Citrus unshiu* Marc.;甘蔗红粉蚧采自海南儋州八一农场,寄主植物为糖蔗 *Saccharum officinarum* L.;石蒜绵粉蚧采自福建厦门,寄主植物为赛葵 *Malvastrum coromandelianum* (L.);番石榴粉蚧采自中国热带农业科学院植物保护环境保护研究所网室,寄主植物为番石榴 *Psidium guajava* L.;木槿曼粉蚧和南洋

表 1　不同地理种群扶桑绵粉蚧的基本信息

Table 1　Collection data of *Phenacoccus solenopsis* specimens from different geographical populations

种群编号 Population no.	地点 Location	纬度/经度/海拔高度 Latitude/Longitude/Altitude	寄主植物 Host plant	采集时间 Collection date	采集人 Collector
1	海南海口 Haikou, Hainan	20°3′26.6″ N, 110°20′0.2″ E, 6 m	大红花 *Hibiscus rosasinensis*	2012.11	张桂芬 Zhang Gui-Fen
2	海南三亚 Sanya, Hainan	18°17′25.4″ N, 109°28′3.4″ E, 4 m	苘麻 *Abutilon theophrasti*	2012.11	张桂芬 Zhang Gui-Fen
3	云南西双版纳 Xishuangbanna, Yunnan	21°53′38″ N, 100°33′13.3″ E, 561 m	大红花 *H. rosasinensis*	2012.10	张桂芬 Zhang Gui-Fen
4	云南玉溪 Yuxi, Yunnan	24°19′55.6″N, 102°32′59.3″E, 1 649 m	金光菊 *Rudbeckia laciniata*	2012.10	张桂芬 Zhang Gui-Fen
5	湖北荆州 Jingzhou, Hubei	30°20′30.6″N, 112°9′3.6″E, 35 m	棉花 *Gossypium hirsutum*	2012.09	张桂芬 Zhang Gui-Fen
6	福建福州 Fuzhou, Fujian	26°4′58.1″N, 119°15′40.7″E, 16 m	蟛蜞菊 *Wedelia chinensis*	2011.11	张桂芬 Zhang Gui-Fen
7	福建厦门 Xiamen, Fujian	24°26′20.4″N, 118°6′43.2″E, 15 m	大红花 *H. rosasinensis*	2011.11	张桂芬 Zhang Gui-Fen
8	福建龙海 Longhai, Fujian	24°27′55.1″N, 117°40′44.8″E, 11 m	赛葵 *Malvastrum coromandelianum*	2011.11	张桂芬 Zhang Gui-Fen
9	广东汕头 Shantou, Guangdong	23°19′19.6″N, 116°40′25″E, 12 m	鬼针草 *Bidens pilosa*	2012.07	田虎 Tian Hu
10	广东广州 Guangzhou, Guangdong	23°5′49.9″N, 113°21′11.9″E, 16 m	大红花 *H. rosasinensis*	2012.11	马骏 Ma Jun
11	广西崇左 Chongzuo, Guangxi	22°25′4.1″N, 107°21′54.4″E, 135 m	大红花 *H. rosasinensis*	2012.08	张桂芬 Zhang Gui-Fen
12	广西南宁 Nanning, Guangxi	22°49′28.6″N, 108°20′13.9″E, 85 m	大红花 *H. rosasinensis*	2012.08	张桂芬 Zhang Gui-Fen
13	广西玉林 Yulin, Guangxi	22°38′55.7″N, 110°10′43.3″E, 78 m	大红花 *H. rosasinensis*	2012.08	张桂芬 Zhang Gui-Fen
14	上海 Shanghai	31°5′21.5″N, 121°26′13.6″E, 10 m	大红花 *H. rosasinensis*	2012.11	陆永跃 Lu Yong-Yue
15	巴基斯坦 Pakistan	30°39′24.5″N, 72°33′13.3″E, 681 m	棉花 *G. hirsutum*	2012.04	马骏 Ma Jun

臀纹粉蚧由广东出入境检验检疫局检验检疫技术中心赠送，其中木槿曼粉蚧采自海南海口，寄主植物为番荔枝 *Annona squamosa*（L.），南洋臀纹粉蚧为口岸截获样本。不同地理种群的扶桑绵粉蚧相关信息如表 1 所示。所有标本均于无水乙醇（乙醇的质量分数≥99.7%）中保存。

1.2　DNA 提取

粉蚧类昆虫 DNA 的提取参照乔玮娜等（2012）的方法并稍加改进。取单头粉蚧成虫，用刀片切取约 1/3 体长的组织，置于滴有 20 μL 提取缓冲液（50 mmol/L Tris-HCl，1 mmol/L EDTA，1% SDS，20 mmol/L NaCl，pH 8.0）的 Parafilm 膜上，以 0.2 mL PCR 管底部作为匀浆器，充分研磨，匀浆液移入 1.5 mL 离心管；用 200 μL 缓冲液分 4 次清洗匀浆器和 Parafilm 膜，移入同一离心管；加入 5 μL 蛋白酶 K（20 mg/mL），充分混匀后置于水浴锅 60℃ 水浴 1 h（中途混匀 2 次）；然后加入 220 μL 氯仿/异戊醇（24∶1，v∶v），轻柔混匀数十次后，冰浴 30 min；以 4℃ 12 000 r/min，离心 20 min，取上清液（约 200 μL）移入另一 1.5 mL 离心管中，加入 440 μL 预冷无水乙醇，轻轻混匀后在 20℃ 冰箱放置 30 min；取出后，于 4℃ 12 000 r/min，离心 20 min，小心弃去上清液；加入 440 μL 预冷 75% 乙醇洗涤，4℃ 12 000 r/min，离心 15 min，小心弃去上清液。然后将离心管倒扣于洁净滤纸上，自然干燥 20 min 后，每管加入 20 μL 超纯水（DNA 浓度为 200 ~ 350 ng/μL），充分溶解后于 －20℃ 保存备用。

1.3　粉蚧类昆虫 COI 基因 5′端序列引物的设计与扩增

根据数据库中已知的粉蚧科昆虫包括柑橘臀纹粉蚧 *Planococcus citri*（Risso）、槭树白粉蚧 *Phenacoccus aceris* Signoret 和双条拂粉蚧 *Ferrisia virgata*（Cockerell）的 COI 基因 5′端的部分碱基序列（GenBank 登录号分别为 HM474286，HM474261 和 HQ179887，长度约为 650 bp），以 MEGA 5.10 软件（Tamura *et al.*，2011）设计粉蚧类昆虫通用型引物 1 对（PZTCOIF1/PZTCOIR1），上游引物 PZTCOIF1 的碱基序列为 5′-TTTTTGGATTTTGATCAGG-3′，下游引物 PZTCOIR1 的碱基序列为 5′-CTTCTGGATGTCCAAAGAATC-3′（上海生工生物工程技术服务有限公司协助合成）。然后，以扶桑绵粉蚧以及康氏粉蚧、南洋臀纹粉蚧、木槿曼粉蚧、甘蔗红粉蚧、新菠萝灰粉蚧、番石榴粉蚧和石蒜绵粉蚧其他 7 种我国常见粉蚧类害虫的成虫 DNA 为模板，进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 25 μL，其中模板 DNA 2 μL，10 × Buffer 2.5 μL（含 Mg^{2+}），dNTPs 0.5 μL（0.2 mmol/L），上游引物和下游引物各 0.5 μL（5 pmol/L），Taq DNA 聚合酶（5 U/μL）0.4 μL，超纯水 18.6 μL。扩增程序为：95℃ 预变性 2 min；40 个循环：94℃ 40 s，49℃ 50 s，72℃ 60 s；最后 72℃ 延伸 5 min。

取 3 μL PCR 扩增产物，加 1 μL 上样缓冲液（0.25% 溴酚兰，40% 蔗糖水溶液），在 1% 琼脂糖凝胶上以 100 V 电泳（电泳液为 0.5 × TBE）分离 50 min 后，以 GelDoc Universal Hood Ⅱ 型凝胶成像系统分析电泳结果。然后，经电泳检测验证合格的 PCR 产物进行双向测序（北京三博远志生物技术有限公司协助完成）。

1.4　扶桑绵粉蚧特异性 SS-COI 引物的设计

根据本研究中扶桑绵粉蚧和康氏粉蚧、南洋臀纹粉蚧、木槿曼粉蚧、甘蔗红粉蚧、新菠萝灰粉蚧、番石榴粉蚧、石蒜绵粉蚧的测序结果及数据库中已公开的柑橘臀纹粉蚧、槭树白粉蚧和双条拂粉蚧的碱基序列，运用软件 Oligo 6.0 软件进行比对分析，设计扶桑绵粉蚧特异性 SS-COI 引物 1 对（PSZTF1/PSZTR1），上游引物 PSZTF1 的碱基序列为 5′-TTTTTGGATTTTGATCAGG-3′，下游引物 PSZTR1 的碱基序列为 5′-TAGCTCTTGAAAGTACTGGAATTGAAAC-3′（上海生工生物工程技术服务有限公司协助合成），其中，上游引物 PSZTF1 的碱基序列与 1.3 节中粉蚧类昆虫通用型引物的上游引物 PZTCOIF1 的碱基序列相同。

1.5　SS-COI 引物的种特异性及灵敏性检验

分别以国内常见的 7 种粉蚧成虫的 DNA 为模板，以扶桑绵粉蚧为阳性对照，检验扶桑绵粉蚧 SS-COI 引物 PSZTF1/PSZTR1 的种特异性。PCR 反应体系为 25 μL，其中模板 DNA 2 μL，10 × Buffer 2.5 μL（含 Mg^{2+}），dNTPs 0.5 μL（0.2 mmol/L），上游引物和下游引物各 0.5 μL（5 pmol/L），Taq DNA 聚合酶（5 U/μL）0.3 μL，超纯水 18.7 μL。反应条件为：95℃ 预变性 2 min；5 个循环：94℃ 40 s，45℃ 50 s，72℃ 60 s；40 个循环：94℃ 40 s，54℃ 50 s，72℃ 60 s；最后 72℃ 延伸 5 min。扩增产物的检测方法同 1.3 节。每种粉蚧分别检测 6 头成虫，并随机以不同型号（iCycler，Bio-Rad 和 Verti，ABI）的 PCR 仪进行验证。同时，以不同虫态/龄期（雌性成虫；1，2 和 3 龄若虫；卵）的扶桑绵粉蚧 DNA 为模板，进行灵敏性检验，每种虫态/

龄期分别检测 6 头。

1.6　不同地理种群扶桑绵粉蚧的检测

以采自我国福建、广东、广西、海南、湖北、上海、云南等 7 个省市 14 个不同地区的扶桑绵粉蚧，以及口岸截获的来自巴基斯坦的扶桑绵粉蚧（表 1）DNA 为模板，以特异性 SS-COI 引物 PSZTF1/PSZTR1 进行 PCR 扩增，每一地理种群分别检测 6 头成虫。

2　结果与分析

2.1　粉蚧类昆虫 COI 基因 5′端序列的扩增及 SS-COI 标记分析

以扶桑绵粉蚧以及田间常见的其他 7 种粉蚧即康氏粉蚧、南洋臀纹粉蚧、木槿曼粉蚧、甘蔗红粉蚧、新菠萝灰粉蚧、番石榴粉蚧和石蒜绵粉蚧成虫的 DNA 为模板，以粉蚧通用型引物 PZTCOIF1/PZTCOIR1 进行 PCR 扩增。电泳检测结果显示，引物 PZTCOIF1/PZTCOIR1 的通用性比较强，8 种粉蚧均能扩增出一条清晰的靶标片段（图 1）；将经电泳检测验证合格的 PCR 产物进行双向测序，结果显示，该片段长约为 630 bp，为 mtDNA COI 基因 5′端的克隆片段。根据 8 种粉蚧的测序结果以及数据库中已有的 3 种粉蚧的碱基序列设计扶桑绵粉蚧特异性 SS-COI 引物 1 对（PSZTF1/PSZTR1），其扩增片段的大小为 546 bp。

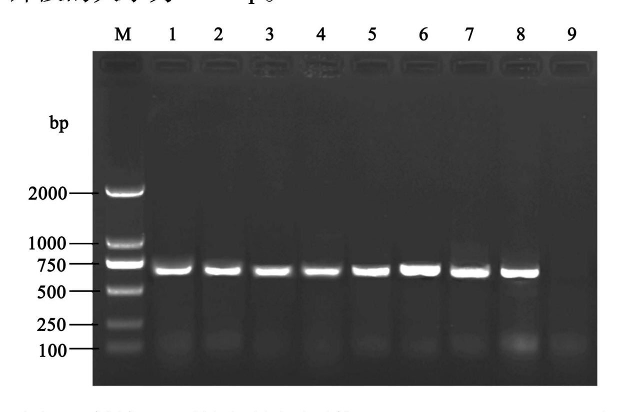


图 1　粉蚧 COI 基因通用型引物 PZTCOIF1/PZTCOIR1 对扶桑绵粉蚧及其他 7 种常见粉蚧的扩增结果电泳检测图

Fig. 1　Gel images of PCR amplicons of *Phenacoccus solenopsis* and other seven common mealybug species using COI gene universal primers PZTCOIF1/PZCOIR1

M：DNA 分子量标准 DNA ladder；1：扶桑绵粉蚧 *P. solenopsis*；2：康氏粉蚧 *Pseudococcus comstocki*；3：南洋臀纹粉蚧 *Planococcus lilacius*；4：木槿曼粉蚧 *Maconellicoccus hirsutus*；5：甘蔗红粉蚧 *Saccharicoccus sacchari*；6：新菠萝灰粉蚧 *Dysmicoccus neobrevipes*；7：番石榴粉蚧 *Planococcus minor*；8：石蒜绵粉蚧 *P. solani*；9：阴性对照（超纯水）Negative control (ultra pure water).

2.2　扶桑绵粉蚧 SS-COI 引物的种特异性及灵敏性检验

以扶桑绵粉蚧以及其他 7 种常见粉蚧成虫的 DNA 为模板，以所设计的特异性 SS-COI 引物 PSZTF1/PSZTR1 进行 PCR 扩增，电泳检测结果显示，该引物只对扶桑绵粉蚧具有扩增效果，对其他近缘属种的 7 种粉蚧不具有扩增能力，表明该对引物为扶桑绵粉蚧的种特异性引物（图 2）。

以不同虫态/龄期的扶桑绵粉蚧 DNA 为模板，以 SS-COI 引物 PSZTF1/PSZTR1 进行 PCR 扩增，电泳检测结果显示，不同虫态/龄期的扶桑绵粉蚧均能稳定地扩增出 546 bp 的特异性片段（图 3）。

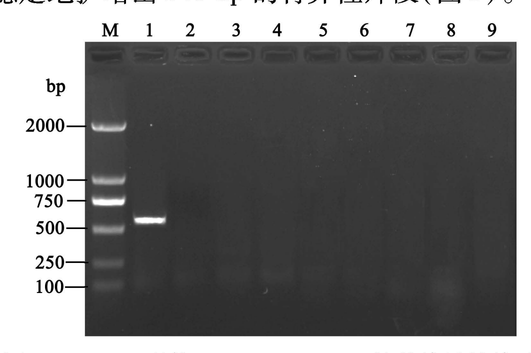


图 2　SS-COI 引物 PSZTF1/PSZTR1 的种特异性检验

Fig. 2　Amplification pattern of mtDNA using SS-COI primers PSZTF1/PSZTR1

M：DNA 分子量标准 DNA ladder；1：扶桑绵粉蚧 *Phenacoccus solenopsis*；2：康氏粉蚧 *Pseudococcus comstocki*；3：南洋臀纹粉蚧 *Planococcus lilacius*；4：木槿曼粉蚧 *Maconellicoccus hirsutus*；5：甘蔗红粉蚧 *Saccharicoccus sacchari*；6：新菠萝灰粉蚧 *Dysmicoccus neobrevipes*；7：番石榴粉蚧 *Planococcus minor*；8：石蒜绵粉蚧 *P. solani*；9：阴性对照（超纯水）Negative control (ultra pure water).

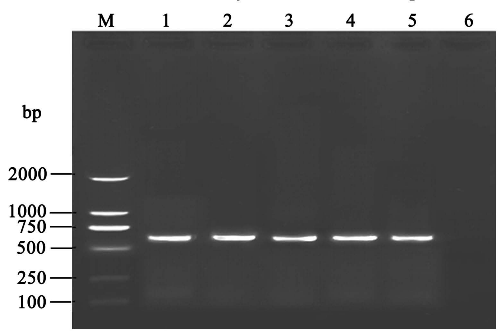


图 3　SS-COI 引物 PSZTF1/PSZTR1 对不同虫态扶桑绵粉蚧的扩增效果

Fig. 3　Amplification pattern of mtDNA from different development stages of *Phenacoccus solenopsis* using SS-COI primers PSZTF1/PSZTR1

M：DNA 分子量标准 DNA ladder；1：成虫 Adult；2：1 龄若虫 1st instar nymph；3：2 龄若虫 2nd instar nymph；4：3 龄若虫 3rd instar nymph；5：卵 Egg；6：阴性对照（超纯水）Negative control (ultra pure water).

2.3 不同地理种群扶桑绵粉蚧的检测

以采自我国 7 个省市 14 个不同地区的扶桑绵粉蚧以及口岸截获的来自巴基斯坦的扶桑绵粉蚧成虫的 DNA 为模板，以 SS-COI 引物 PSZTF1/PSZTR1 进行 PCR 扩增。检测结果显示，不同地理种群的扶桑绵粉蚧都能扩增出清晰的靶标片段(图 4)，表明该技术体系完全可用于出入境植物种苗调运中扶桑绵粉蚧的检测。

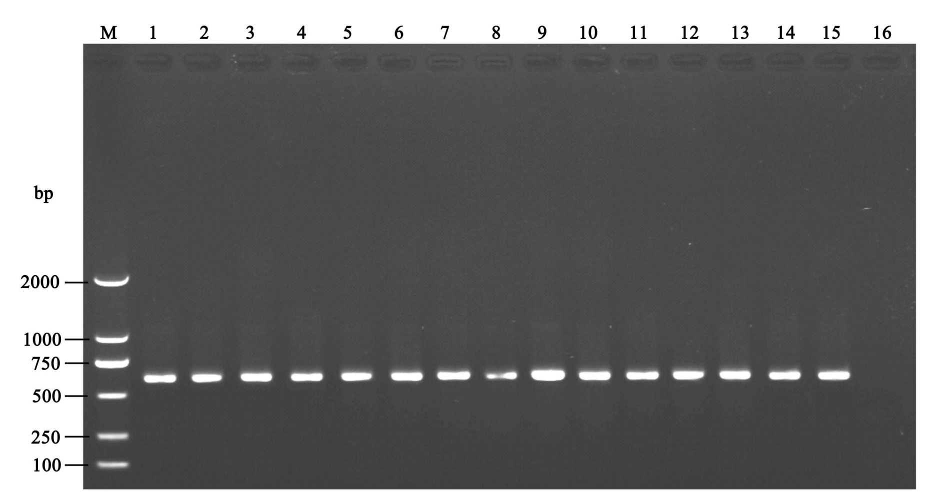


图 4 SS-COI 引物 PSZTF1/PSZTR1 对 15 个不同地理种群扶桑绵粉蚧的检测电泳图

Fig. 4 Amplification pattern of mtDNA from 15 different geographical populations of *Phenacoccus solenopsis* collected in different areas of China and Pakistan using SS-COI primers PSZTF1/PSZTR1

M：DNA 分子量标准 DNA ladder；1 - 15：不同地理种群的扶桑绵粉蚧(种群编号同表 1) Different geographical populations of *P. solenopsis* (the population no. as in Table 1)；16：阴性对照(超纯水)Negative control (ultra pure water).

3 讨论

外来入侵生物的识别鉴定是有效防范潜在入侵物种传入和局部发生入侵物种进一步传播扩散的必要前提。扶桑绵粉蚧作为我国近年来新发现的入侵害虫，因其具有寄主范围广、适应性强、严重威胁农林业生产等特点而备受关注(王艳平等，2009；武三安和张润志，2009；马骏等，2011)，而研究其快速检测与准确识别技术对于开展扶桑绵粉蚧生物生态学和综合防控技术等研究意义重大，同时也是有效阻截其进一步扩散蔓延，保障农业生产和生态环境安全的必要前提。目前，扶桑绵粉蚧的种类识别主要依据成虫的外部形态特征，对非成虫态如若虫、卵则无能为力(Hodgson *et al.*，2008；Arif *et al.*，2009)；此外，由于成虫与本地近缘种粉蚧如石蒜绵粉蚧在外部形态上极为相似(马骏等，2009；武三安和张润志，2009；朱艺勇等，2011)，使基于形态特征的物种鉴定与识别困难重重，尤其对非从事专门类群形态学研究的人员。

近年来分子生物学技术发展迅速，基于分子标记技术的粉蚧类昆虫的识别鉴定研究，由于不受雌雄性别、样本完整程度以及发育阶段的限制(Cook *et al.*，2002；Malausa *et al.*，2009；Ashfaq *et al.*，2010；Hosseini and Hajizadeh，2011；Park *et al.*，2011；何衍彪等，2012)，并具有简便、快速、高通量等特点，而逐渐得到广泛应用，如：Gullan 等(2003)通过扩增核基因和线粒体基因序列及其比对分析，并结合外部形态特征定义了一种新的粉蚧 *Ferrisia gilli* Gullan。Saccaggi 等(2008)利用多重 PCR 方法扩增 mtDNA COI 序列，通过序列特征分析成功地将葡萄绵粉蚧 *Planococcus ficus* Signoret、柑橘臀纹粉蚧和长尾粉蚧 *Pseudococcus longispinus* Targioni 区别开来。何衍彪等(2012)通过对 12 种粉蚧的 18S rDNA，28S rDNA 和 COI 序列的多重比对和聚类分析，探讨了其用于粉蚧系统进化分析及种类鉴定的可行性，结果表明 COI 基因的序列变异率相对较高，完全可作为近缘属种粉蚧类昆虫识别的依据。然而，由于需要对扩增产物进行测序，成本较高且花费时间长，因此难以满足高通量快速检测的需求。而在 mtDNA COI 基因序列分析技术基础上发展起来的 SS-COI 分子标记技术，具有重现性好且谱带单一等诸多优点，因此适宜于大规模快速检测分析(Bucklin *et al.*，1999；Vestheim *et al.*，

2005；Wang and Guo，2008；张桂芬等，2012）。

本研究根据已知的 3 种粉蚧科昆虫的 COI 基因序列设计通用型引物，成功地扩增出了扶桑绵粉蚧以及其他 7 种我国常见粉蚧的 5′端 COI 基因片段，然后根据测序结果并结合数据库中已有 3 种粉蚧的相关碱基序列，设计了 1 对扶桑绵粉蚧特异性 SS-COI 引物 PSZTF1/PSZTR1。种特异性检验结果显示，该 SS-COI 引物只对扶桑绵粉蚧具有扩增效果，对常见的其他粉蚧科害虫如康氏粉蚧、南洋臀纹粉蚧、木槿曼粉蚧、甘蔗红粉蚧、新菠萝灰粉蚧、番石榴粉蚧等以及同属近缘种石蒜绵粉蚧不具有扩增能力；而且，对采自我国 7 个省市 14 个不同区域的扶桑绵粉蚧和不同虫态的扶桑绵粉蚧，以及口岸截获的来自巴基斯坦的扶桑绵粉蚧等都具有同样的检测效果。对靶标序列的 GenBank 比对结果显示，该片段与扶桑绵粉蚧的一致性为 100%（Park *et al.*，2011），而与其他粉蚧类昆虫的一致性均低于 87%（http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi）。结果表明，该 SS-COI 检测技术体系完全可用于口岸检疫，以及蔬菜、花卉及其种苗调运中扶桑绵粉蚧的检测及其扩张趋势和发生危害监测。然而，由于粉蚧科昆虫的种类较多，有许多种类本研究未曾涉及，为此该对 SS-COI 引物的特异性有待进一步验证。

参考文献（References）

Arif MI, Rafiq M, Ghaffar A, 2009. Host plants of cotton mealybug (*Phenacoccus solenopsis*): a new menace to cotton agroecosystem of Punjab, Pakistan. *International Journal of Agriculture and Biology*, 11: 163–167.

Ashfaq M, Noor AR, Mansoor S, 2010. DNA-based characterization of an invasive mealybug (Hemiptera: Pseudococcidae) species damaging cotton in Pakistan. *Applied Entomology and Zoology*, 45(3): 395–404.

Bucklin A, Guarnieri M, Hill RS, Bentley AM, Kaartvedt S, 1999. Taxonomic and systematic assessment of planktonic copepods using mitochondrial COI sequence variation and competitive, species-specific PCR. *Hydrobiologia*, 401: 239–254.

Chen Z, Zhang J, Fu HF, Xu ZZ, Deng KZ, Zhang JY, 2012. On the validity of the species *Phenacoccus solenopsis* based on morphological and mitochondrial COI data, with the description of a new body color variety. *Biodiversity Science*, 20(4): 443–450. [陈哲，张姜，傅杭飞，许争争，邓坤正，张加勇，2012. 基于形态特征和线粒体 COI 基因探讨扶桑绵粉蚧物种的有效性并记述一体色变异型扶桑绵粉蚧. 生物多样性，20(4): 443–450]

Chu D, Liu GX, Fu HB, Xu W, 2009. Phylogenetic analysis of mt COI reveals the cryptic lineages in *Phenacoccus solenopsis* complex (Hemiptera: Pseudococcidae). *Acta Entomologica Sinica*, 52(11): 1261–1265.

Cook LG, Gullan PJ, Trueman HE, 2002. A preliminary phylogeny of the scale insects (Hemiptera: Sternorrhyncha: Coccoidea) based on nuclear small-subunit ribosomal DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 25: 43–52.

Dutt U, 2007. Mealybug infestation in Punjab: Bt cotton falls flat. Online article at: http://www.countercurrents.org/dutt210807.htm (5th February, 2013).

Gullan PJ, Downie DA, Steffan SA, 2003. A new pest species of the mealybug genus *Ferrisia* Fullaway (Hemiptera: Pseudococcidae) from the United States. *Annals of the Entomological Society of America*, 96(6): 723–737.

He YB, Wan XW, Zhan RL, Sun GM, Liu YH, Xu ZF, Zhao YL, 2011. Genetic relationship of 12 species of mealybugs (Hemiptera: Pseudococcidae) based on DNA sequences. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 32(12): 2324–2330. [何衍彪，万宣伍，詹儒林，孙光明，刘映红，许再福，赵艳龙，2011. 基于 DNA 序列的 12 种粉蚧亲缘关系分析. 热带作物学报，32(12): 2324–2330]

Hodgson C, Abbas G, Arif MJ, Saeed S, Karar H, 2008. *Phenacoccus solenopsis* Tinsley (Sternorrhyncha: Coccoidea: Pseudococcidae), an invasive mealybug damaging cotton in Pakistan and India, with a discussion on seasonal morphological variation. *Zootaxa*, 1913: 1–35.

Hosseini R, Hajizadeh J, 2011. Molecular identification of three of the most important mealybug species (Hemiptera: Sternorrhyncha: Coccoidea: Pseudococcidae) on ornamental plants in Guilan province, Iran. *Zootaxa*, 3009: 46–54.

Ma J, Hu XN, Liu HJ, Liang F, Zhao JP, Feng LX, Chen NZ, 2009. *Phenacoccus solenopsis* Tinsley was found on *Hibiscus rosasinensis* in Guangzhou. *Plant Quarantine*, 23(2): 35–36. [马骏，胡学难，刘海军，梁帆，赵菊鹏，冯黎霞，陈乃中，2009. 广州扶桑上发现扶桑绵粉蚧. 植物检疫，23(2): 35–36]

Ma J, Hu XN, Peng ZQ, Liu HJ, Liang F, Lu YY, 2011. The potential geographical distribution of *Phenacoccus solenopsis* Tinsley based on the CLIMEX in China. *Plant Quarantine*, 25(1): 5–8. [马骏，胡学难，彭正强，刘海军，梁帆，陆永跃，2011. 基于 CLIMEX 模型的扶桑绵粉蚧在中国潜在地理分布预测. 植物检疫，25(1): 5–8]

Malausa T, Fenis A, Warot S, Germain JF, Ris N, Prado E, Botton M, Masutti FV, Sforza R, Cruaud C, Couloux A, Kreiter P, 2009. DNA markers to disentangle complexes of cryptic taxa in mealybugs (Hemiptera: Pseudococcidae). *Journal of Applied Entomology*, 135: 142–155

Park DS, Suh SJ, Hebertp DN, Oh HW, Hong KJ, 2011. DNA barcodes for two scale insect families, mealybugs (Hemiptera: Pseudococcidae) and armored scales (Hemiptera: Diaspididae). *Bulletin of Entomological Research*, 101: 429–434.

Qiao WN, Wan FH, Zhang AB, Min L, Zhang GF, 2012. Application of DNA barcoding technology for species identification of common thrips (Insecta: Thysanoptera) in China. *Acta Entomologica Sinica*, 55(3): 344–356. [乔玮娜，万方浩，张爱兵，闵亮，张

桂芬，2012. DNA 条形码技术在田间常见蓟马种类识别中的应用. 昆虫学报，55(3)：344－356]

Saccaggi DL, Krüger K, Pietersen G, 2008. A multiplex PCR assay for the simultaneous identification of three mealybug species (Hemiptera：Pseudococcidae). *Bulletin of Entomological Research*, 98：27－33.

Singh S, Sharma R, Kumar R, Gupta VK, Dilawari VK, 2012. Molecular typing of mealybug *Phenacoccus solenopsis* populations from different hosts and locations in Punjab, India. *Journal of Environmental Biology*, 33：539－543.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S, 2011. MEGA5：molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10)：2731－2739.

Tinsley JD, 1898. Notes on Coccidae, with descriptions of new species. *Canadian Entomologist*, 30：317－320.

Vennila S, Deshmukh AJ, Pinjarkar D, Agarwal M, Ramamurthy VV, Joshi S, Kranthi KR, Bambawale OM, 2010. Biology of the mealybug, *Phenacoccus solenopsis* on cotton in the laboratory. *Journal of Insect Science*, 10(115)：1－9.

Vestheim H, Edvardsen B, Kaartvedt S, 2005. Assessing feeding of a carnivorous copepod using species-specific PCR. *Marine Biology*, 147：381－385.

Wang HY, Guo XM, 2008. Identification of *Crassostrea ariakensis* and related oysters by multiplex species-specific PCR. *Journal of Shellfish Research*, 27(3)：481－487.

Wang YP, Wu SA, Zhang RZ, 2009. Pest risk analysis of a new invasive pest, *Phenacoccus solenopsis*, to China. *Chinese Bulletin of Entomology*, 46(1)：101－106.［王艳平，武三安，张润志，2009. 入侵害虫扶桑绵粉蚧在中国的风险分析. 昆虫知识，46(1)：101－106］

Wu SA, Zhang RZ, 2009. A new invasive pest, *Phenacoccus solenopsis*, threatening seriously to cotton production. *Chinese Bulletin of Entomology*, 46(1)：159－162.［武三安，张润志，2009. 威胁棉花生产的外来入侵新害虫——扶桑绵粉蚧. 昆虫知识，46(1)：159－162］

Zhang GF, Liu WX, Guo JY, Lü ZC, Wan FH, Shen XJ, 2012. Species-specific PCR primers for identification of *Liriomyza sativae* Blanchard. *Journal of Biosafety*, 21(1)：74－78.［张桂芬，刘万学，郭建英，吕志创，万方浩，申香菊，2012. 美洲斑潜蝇 SS-PCR 检测技术研究. 生物安全学报，21(1)：74－78］

Zhu YY, Huang F, Lü YB, 2011. Bionomics of mealybug *Phenacoccus solenopsis* Tinsley (Hemiptera：Pseudococcidae) on cotton. *Acta Entomologica Sinica*, 54(2)：246－252.［朱艺勇，黄芳，吕要斌，2011. 扶桑绵粉蚧生物学特性研究. 昆虫学报，54(2)：246－252］

（责任编辑：赵利辉）